

В результате проведенных исследований, нами были установлены некоторые физиологические и молекулярно-генетические особенности у разных по продуктивности сортов лаванды. Таким образом, анализируемые сорта отличались не только урожайностью и масличностью, но и содержанием ядер и яДНК.

1. М.А. Кузнецова. Лекарственное растительное сырье и препараты. - М., 1987. - 190 с.
2. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Софронич. Химический анализ лекарственных растений. - М., 1983. - 176 с.
3. Д.А. Муравьева. Фармакогнозия. - М.: Медицина, 1991. - 560 с.
4. Правила сбора и сушки лекарственных растений. - М., 1985. - 321 с.
5. Б.К. Исаков, М.А. Айтхожин. Выделение белков информсом и анализ их с помощью двумерного электрофореза // Методы молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии растений. Алма-Ата: Наука, 1988. - с.5.
6. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. - М.: Мир, 1991. - 408 с.
7. Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - 480 с.

ПОЛИМОРФИЗМ ХИТИН-СПЕЦИФИЧНОГО САЙТА ГЕНА АНИОННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ У РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

О.И. Кузьмина, Г.Ф.Бурханова, И.В. Максимов

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия
phyto@anrb.ru*

Гены, кодирующие III класс пероксидаз, присутствуют у всех наземных растений. Многие исследователи предполагают, что их эволюционное формирование связано с адаптацией растений к наземной жизни в присутствии кислорода. Со времени появления первой пероксидазы класса III количество генных копий этого фермента сильно увеличилось. В некоторых растениях, например, *Oryza sativa*, обнаружено до 138 генов, кодирующих пероксидазы этого класса, а у *Arabidopsis thaliana* – до 73 [1, 2]. Важно отметить, что эта группа пероксидаз является генетически гетерогенной и гомология внутри этого класса может составлять от 30 до 100%. Причем относительно высокой гомологией могут обладать пероксидазы из эволюционно отдаленных видов растений [3].

Значительный интерес к ферментам с пероксидазной активностью обусловлен, прежде всего, разнообразием выполняемых ими функций. Например, известно их участие в лигнификации и суберинизации клеточных стенок, устойчивости к разным заболеваниям, перекрестном сшивании структурных белков клеточных стенок, катаболизме ауксина, защите при окислительном стрессе, клеточном растяжении, генерации реактивных форм кислорода [2, 4, 5].

На фоне активного изучения физиологических функций пероксидаз роль структуры белковой части ее молекулы в последующем проявлении растениями устойчивости к фитопатогенам пока остается слабо изученной. Ранее в нашем институте было показано, что из множества пероксидаз мягкой пшеницы только анионные изоформы с изоэлектрической точкой 3.5 способны к ионообменной сорбции на хитин [6]. Молекулярно-биологическими методами эти изоформы ранее не исследовались. В связи с этим цель этой работы – выявление полиморфизма хитин-специфичного сайта гена пероксидазы у разных видов растений.

Работа проводилась с использованием ДНК разных видов растений из полиплоидного ряда пшеницы (род *Triticum*), эгилопса (род *Aegilops*). Для исследования межвидового сходства хитин-специфичных пероксидаз разных видов растений проводили сравнение фрагмента хитин-связывающего сайта гена анионной пероксидазы пшеницы с предполагаемыми аминокислотными последовательностями анионных пероксидаз других видов растений из базы данных [<http://peroxidase.isb-ib.ch>]. В анализ были вовлечены данные

о генах пероксидаз арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), огурца посевного (*Cucumis sativus* L.), цуккини (*Cucurbita pepo* L. var *giromontia* Duch), табака (*Nicotiana tabacum* Link et Otto), лука репчатого (*Allium cepa*), капусты белокочанной (*Brassica oleraceae*), хрена (*Armoracia rusticana*), петунии (*Petunia hybrida*), картофеля (*Solanum tuberosum*), арахиса (*Arachis hypogaea*), гороха посевного (*Pisum sativum*). Компьютерный анализ предполагаемых аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы DNASIS, а также пакета программ Lasergene 5.5 фирмы «DNASTAR, Inc.».

Обнаружено, что у пшеницы и эгилопса проявлялся амплификат размером 190-200 п.н., который совпадал с теоретически рассчитанными размерами (рис. 1). Данный факт подтверждает предположение о сходной организации этого участка гена у злаковых.

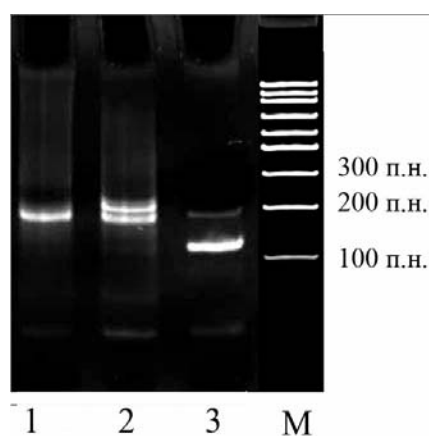


Рис. 1. Продукты амплификации гена анионной пероксидазы на разных видах пшеницы и арабидопсиса 1-*Tr. aestivum*, 2-*Ae. taushii*, 3-*Arabidopsis thaliana*.

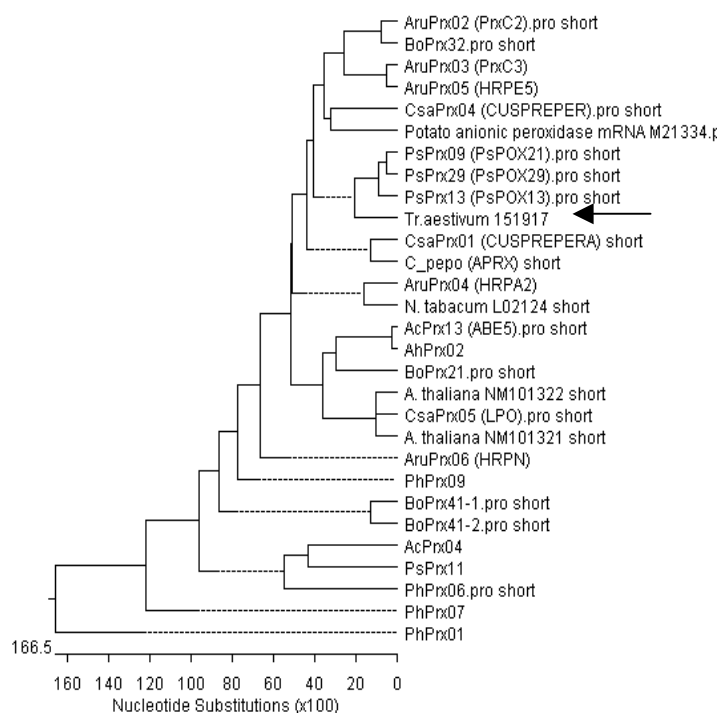


Рис. 2. Филогенетическое древо, показывающее эволюционное родство между пероксидазами разных видов растений.

Интересно, что с использованием праймеров к гену анионной пероксидазы пшеницы и ДНК *Arabidopsis thaliana* был получен амплификат размером около 150 п.н. (рис.1). Анализ множества генов, кодирующих пероксидазы у *Arabidopsis thaliana*, показал, что только в одном из них подобный мотив совпадал по размерам с амплификатом из рис. 1. При использовании ДНК других видов растений, к сожалению, искомым амплификат не образовывался, что может быть связано с условиями проведения ПЦР или неспецифичностью праймеров.

Сравнительный анализ участков генов пероксидаз исследованных видов растений показал определенное сходство между ними. Гомология с таковым у цуккини *APRX* составляла 65,2%, арабидопсиса *NM101321*, хрена *AruPrx02* и огурца *CsaPrx01*-по 60,9%, петунии *PhPrx06*, картофеля *M21334* – по 52,2%, табака *L02124* – 43,5%, а у лука *AcPrx04* было наименьшим – 26,1%. Наибольшая гомология анионной пероксидазы пшеницы обнаружена с аминокислотной последовательностью гороха *PsPrx09* – 73,9% (рис. 2).

Свойство пероксидазы сорбироваться на хитин предполагает ее участие в процессах, лежащих в основе защитных реакций растений против хитин-содержащих фитопатогенов.

Наши исследования показали, что предположительная аминокислотная последовательность полисахрид-специфичных пероксидаз разных видов растений зачастую имеет высокую степень гомологии, что может быть обусловлено их эволюционным происхождением.

Работа выполнена при финансовой поддержке международного проекта РФФИ (№08-04-90259-Узб-а).

1. F. Passardi, C. Penel, C. Dunand. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall // Plant Science. – 2004. – V. 9. – P. 534–540.
2. G. Liu, X. Sheng, D. Greenshields, A. Ogieglo. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns // Molecular Plant-Microbe Interaction. – 2005. – V. 18. – P. 730–741.
3. N. Bacalovic, F. Passard, V. Ioannidis, C. Cosio, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand. PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. // Phytochemistry. – 2006. – V. 67. – P. 534–539.
4. M.L. Lagrimini, R.J. Joly, J.R. Dunlap, T.T. Liu. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development // Plant Molecular Biology. – 1997. – V.33. – P. 887–895.
5. K. Yoshida, P. Kaothich, T. Matsui, A. Kawaoka, A. Shinmyo. Molecular biology and application of plant peroxidase genes // Apply Microbiology Biotechnology. – 2003. – V. 60. – P. 665–670.
6. И.В. Максимов, Е.А. Черепанова, Л.Г. Яруллина, И.Э. Ахметова. Выделение «хитин-специфичных» оксидоредуктаз пшеницы // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, №6. – С.616–620.

ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ СИНТЕЗА КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ДНК *Solanum melongena* L.

Е.В. Кулик, А.Н. Евтушенко

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
alena.akhrymuk@tut.by

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) с использованием в качестве исходного материала мРНК является ключевым этапом в исследовании экспрессии генов. Полноразмерная библиотечная кДНК обеспечивает целостное представление обо всех последовательностях мРНК, экспрессируемых в организме. Использование дрожжевой двухгибридной системы и сконструированной кДНК библиотеки баклажана (*Solanum melongena* L.) позволит выявить гены, кодирующие R-белки, которые определяют резистентность к фитопатогенным грамотрицательным бактериям *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. Указанные бактерии вызывают стремительное развитие таких заболеваний картофеля (*Solanum tuberosum* L.), как «мягкая гниль» и «чёрная ножка». Это обусловлено тем, что данный представитель растений семейства пасленовых не содержит R-белки. Выявление генов, детерминирующих синтез R-белков, позволит в дальнейшем конструировать трансгенные растения, устойчивые к различным патогенам.

Одним из важных этапов на пути создания двухцепочечной кДНК является получение высококачественной мРНК. Однако выделение мРНК из растительной ткани довольно проблематично, поскольку полисахариды и полифенолы образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами и в последующем осаждаются этанолом [1, 2, 3, 4]. Следовательно, метод очистки мРНК из растительной ткани требует тщательной оптимизации. Одним из способов по выделению мРНК из растительной ткани является получение тотальной РНК с последующей очисткой мРНК методом хроматографии с применением oligo(dT)-целлюлозы. Однако, ранее применив данный способ для выделения мРНК из листьев табака (*Nicotiana tabacum* L.), было обнаружено, что после первого раунда очистки количество мРНК составляет около 50%, и в образце содержатся 18S и 25S рРНК, детектируемые после проведения электрофореза на геле с бромистым этидием (рис. 1). Выход мРНК после повторного очищения может достичь 90 %, однако при этом будут наблюдаться потери продукта. Поскольку данный способ не позволял выделить мРНК необходимого качества, был использован коммерческий набор PolyA Tract System 1000 Promega для выделения мРНК из